Aus dem Röntgeninstitut der Universität Bern
Direktor: Prof. Dr. Ad. Liechti
und dem physiologischen Institut (Hallerianum) der Universität Bern
Direktor: Prof. Dr. A. von Muralt

Arbeit unter Leitung von P.-D. Dr. Wilbrandt

Über den Einfluss der Temperatur bei der Strahlenhämolyse

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Würde eines Doctor medicinae
der Universität Bern

vorgelegt von

Paul Fischer
aus Luzern

Sonderabdruck aus „Strahlentherapie", 74. Band (1944)

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Auf Antrag des Herrn Prof. Dr. Ad. Liechti von der medizinischen Fakultät zum Druck als Dissertation genehmigt.

Bern, den 8. Dezember 1943.

Der Dekan der Medizinischen Fakultät:

Prof. Dr. E. Glanzmann.

In früheren Arbeiten (1—4) war gezeigt worden, daß die durch Röntgen- und Ultraviolettstrahlen auslösbaren Hämolysen prinzipiell auf dem gleichen Mechanismus beruhen. Die normalerweise nur für Anionen permeable Erythrozytenmembran wird nach der Bestrahlung auch für Kationen durchlässig. Die Folge ist, daß nach dem Donnanmechanismus Salz und Wasser in die Zellen eindringt, so daß es zu einer osmotischen Schwellung kommt, die bis zur Hämolyse führen kann. Da letzten Endes die treibende Kraft für den Wassereintritt in die Zellen unter diesen Bedingungen der kolloidosmotische Druck des Hämoglobins ist, wurden solche Hämolysen in einer früheren Mitteilung (5) als „kolloidosmotische Hämolysen" bezeichnet. Die Strahlenhämolysen durch Ultraviolett- und Röntgenstrahlen gehören also ebenso wie eine Reihe anderer Hämolysen, von denen das bisher noch nicht bekannt war (Wärme, Saponin, Alkohol, Äther, Azeton, Säure, Alkalihämolyse und andere) zur Gruppe der kolloidosmotischen Hämolysen.

Die Geschwindigkeit, mit der das Salz in die kationenpermeabel gewordenen Zellen eindringt, hängt bei gleicher Strahlendosis vor allem von den anwesenden Ionen und der Temperatur ab. Limitierender Faktor ist die Geschwindigkeit des Kationeneintritts, der auch bei bestrahlten Erythrozyten ungleich langsamer erfolgt als derjenige der Anionen. Die Kationen beeinflussen daher die Schwellungsgeschwindigkeit in der Reihenfolge ihrer Diffusionsfähigkeiten. Die Anionen, obwohl sie auf Grund ihrer Diffusionsgeschwindigkeit nicht von Bedeutung sein können, beeinflussen die Schwellungsgeschwindigkeit jedoch ebenfalls, woraus

zu schließen ist, daß sie die Permeabilität der Zellen verändern. Sie stufen sich in bezug auf ihre Wirksamkeit in dieser Hinsicht nach der lyotropen Reihe ab, Sulfat wirkt am wenigsten, Rhodanid und Salizylat am stärksten.

Die Ursache der Permeabilitätsänderung ist offenbar eine Denaturierung von Membraneiweiß. Dafür spricht, daß alle bisher untersuchten eiweißdenaturierenden Agentien hämolytisch wirken und daß diese Hämolysen alle kolloidosmotisch sind, ferner, daß ebenso wie bei der Eiweißdenaturierung die Wirkung des Salizylats sich als reversibel erweisen ließ, und schließlich, daß eiweißdenaturierende Strahlenwirkungen bekannt sind.

Überraschend war zunächst der Einfluß des zweiten die Hämolysegeschwindigkeit beeinflussenden Faktors, der Temperatur. Es zeigte sich nämlich, daß bei niedrigen Temperaturen unterhalb von 20° C der Temperaturkoeffizient kleiner als eins wird, d. h. daß die Schwellungsgeschwindigkeit mit sinkender Temperatur zunimmt („negativer" Temperaturkoeffizient nach dem nicht ganz korrekten Sprachgebrauch). Dieser Effekt war durch die Annahme gedeutet worden, daß der Ionenwirkung auf die Membran eine adsorptive Fixierung der Ionen vorausgehen muß, die, wie das von Adsorptionsvorgängen bekannt ist, bezüglich der adsorbierten Menge einen „negativen Temperaturkoeffizienten" hat.

Der erste Teil der vorliegenden Arbeit beschäftigt sich mit der Fortführung dieses Gedankens. Es wurde zunächst geprüft, ob bei Variation der Salizylatkonzentration die quantitative Änderung der Hämolysegeschwindigkeit mit der Adsorptionsannahme in Einklang steht. Anschließend wurde unter dem gleichen Gesichtspunkt der Verlauf der Temperaturabhängigkeit der Hämolysegeschwindigkeit bei Variation der Salizylatkonzentration und in späteren Versuchen bei Verwendung verschiedener Salze untersucht.

Dabei zeigte sich weiter, daß die Temperaturabhängigkeit noch durch einen zweiten von der Salizylatkonzentration abhängigen Faktor beeinflußt wird, der sich vor allem bei höheren Temperaturen bemerkbar macht: der Temperaturkoeffizient der Membrandiffusion. Mit steigender Salizylatkonzentration und zunehmender Hämolysegeschwindigkeit sinkt er. Die Ursache dieses Zusammenhangs wird diskutiert.

Im zweiten Teil der Arbeit werden Versuche mitgeteilt, die den Einfluß der Temperatur bei der Strahlenhämolyse betreffen, und zwar im Gegensatz zu den bisher erwähnten Versuchen nicht die Temperatur während der Schwellung, also der Nachphase, sondern während der Bestrahlung selbst. Nach den Anschauungen von Dessauer und Rajewsky (6), die auf Grund von Versuchen in vitro ebenfalls der eiweißdenaturierenden

Strahlenwirkung eine primäre Bedeutung zumessen, wäre die Temperaturabhängigkeit der Denaturierung durch Ultraviolett und durch Röntgenstrahlen verschieden zu erwarten. Da für die Strahlenhämolyse Eiweißdenaturierung mit großer Wahrscheinlichkeit eine ursächliche Bedeutung hat, lag es nahe, diese Anschauungen am Erythrozyten experimentell zu prüfen.

Methodik

Die Methodik zur Verfolgung der Hämolyse bzw. der osmotischen Schwellung war die gleiche wie in den vorhergehenden Arbeiten. Zur Herstellung konstanter Temperaturen wurden elektrisch geheizte Wasserbäder benützt, deren Heizung durch ein Quecksilberkontaktthermometer über ein Relais gesteuert wurde.

A. Die Abhängigkeit der Hämolysegeschwindigkeit von den Bedingungen der Schwellungsphase

1. Die Salizylatkonzentration

Die Annahme einer „Adsorption" der Anionen als Voraussetzung der Eiweißdenaturierung basiert nur auf der Temperaturabhängigkeit der Hämolysegeschwindigkeit. Über die Natur der Kräfte, die die „adsorptive" Bindung bewirken, ist daraus nichts abzuleiten und soll daher zunächst auch keine Annahme gemacht werden. Es muß sich nur um eine Bindung handeln, deren freie Energie so gering ist, daß die kinetische Energie der Moleküle mit ihr konkurrieren kann. Dann ist ein „negativer Temperaturkoeffizient" des Eiweißdenaturierungsgrades und wenn die Ionenpermeabilitätsänderung in Salyzylatlösung oder nach Bestrahlung auf Denaturierung beruht, der Geschwindigkeit der Hämolyse zu erwarten. Daß der Denaturierungsgrad von Eiweiß unter geeigneten Bedingungen tatsächlich einen „negativen" Temperaturkoeffizienten hat, wird in einer späteren Arbeit gezeigt werden.

Für eine „Adsorptions"-Bindung der Anionen wäre nun zu erwarten, daß sie mit steigender Anionenkonzentration, wie das von Adsorptionsvorgängen bekannt ist, einer Sättigung zustrebt. Ähnliche Konzentrationsabhängigkeit müßte dann auch die durch Anionenadsorption ausgelöste Permeabilitätsänderung zeigen. Unter diesem Gesichtspunkt wurde die Abhängigkeit der Hämolysegeschwindigkeit von der Salizylatkonzentration untersucht.

Bild 1 zeigt eine Reihe von Versuchen, in denen Blut 1:10 in Kaliumsalizylatlösung steigender Konzentration suspendiert und die Schwellungsgeschwindigkeit mit Hilfe der zeitlichen Änderung der osmotischen Resistenz, wie in den vorhergehenden Arbeiten geschildert, verfolgt

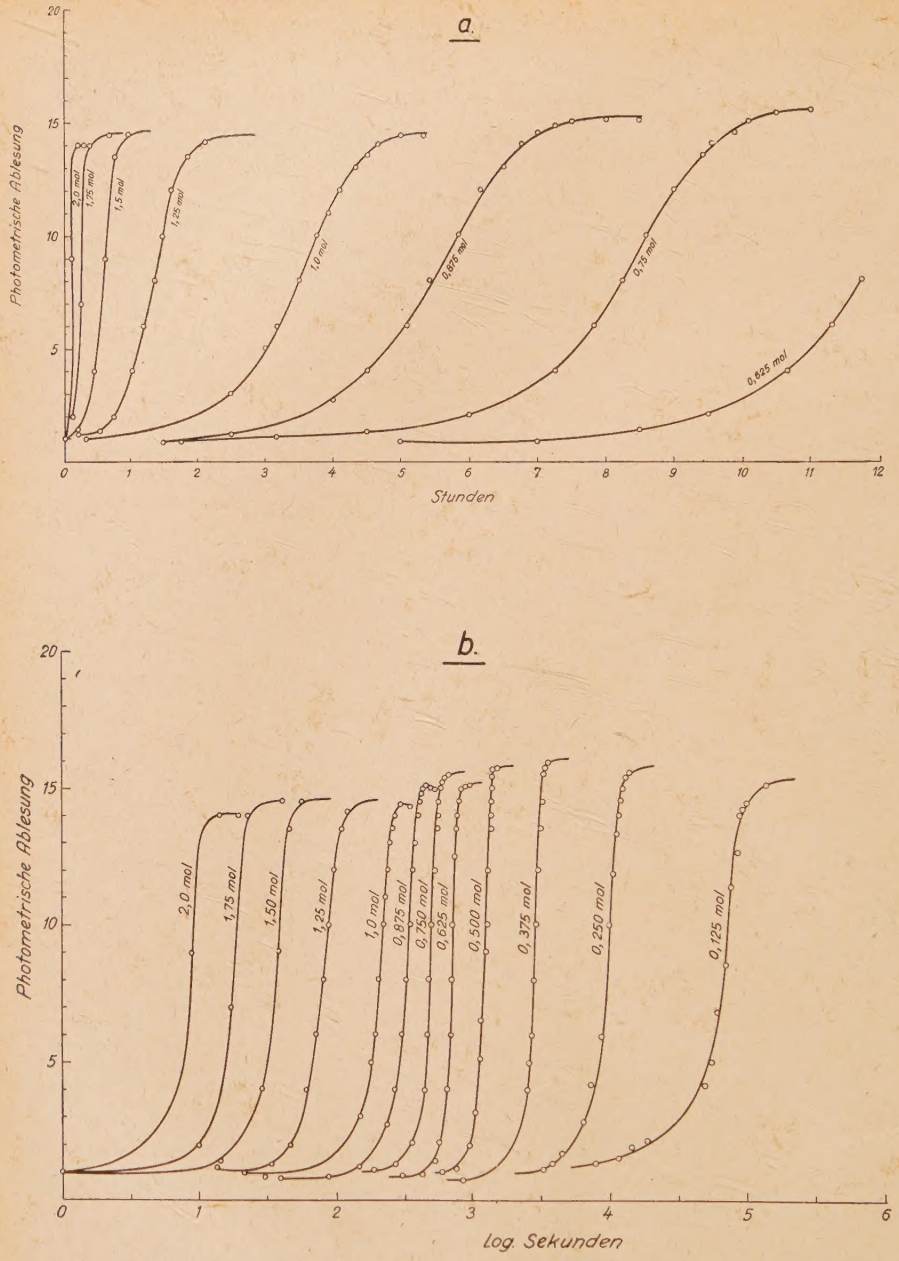

Bild 1. Hämolysekurven in Kaliumsalizylatlösungen von verschiedener Konzentration.
a) mit linearem Zeitmaßstab b) mit logarithmischem Zeitmaßstab.
Ordinate: Photostrom als Maß der Durchsichtigkeit.
Abszisse: Zeit.

wurde. Die Abszisse gibt die Zeit wieder, die Ordinate die photometrische Ablesung der Suspension. Mit steigender Salizylatkonzentration nimmt die Geschwindigkeit der Hämolyse, besonders bei höheren Konzentrationen, sehr steil zu.

Um ein quantitatives Maß für die Schwellungsgeschwindigkeit zu bekommen, wurden die Zeiten bis zur Erreichung einer bestimmten photometrischen Ablesung in allen Kurven ausgemessen und ihre reziproken Werte als relatives Maß der Schwellungsgeschwindigkeit genommen. Wieweit auf diese Weise exakte Geschwindigkeitszahlen erhältlich sind, hängt davon ab, ob bei Verwendung verschiedener photometrischer Ablesungswerte das Verhältnis der Geschwindigkeiten identisch wird oder nicht, d. h. ob der Verlauf der Kurven gleichartig ist. Am einfachsten läßt sich diese Frage prüfen, wenn man die photometrischen Ablesungen nicht gegen die Zeit, sondern gegen den Logarithmus der Zeit aufträgt. Haben die Kurven gleiche Form, so ergeben sich in diesem Fall parallel gegeneinander verschobene Kurven. Bild 1b zeigt für die Versuche in Salizylatlösungen, daß diese Voraussetzung hier befriedigend erfüllt ist. In solchen Fällen ist es gleichgültig, aus welcher photometrischen Ablesung man das Verhältnis der Schwellungsgeschwindigkeiten bestimmt, und es genügt, einige wenige Ablesungen in der Nähe des benützten Wertes auszuführen, um die Geschwindigkeit zu bestimmen. Leider sind jedoch, wie weiter unten gezeigt werden wird, die Schwellungskurven nicht unter allen Versuchsbedingungen vergleichbar, so daß bei jeder neuen Versuchsanordnung zunächst durch Aufnehmen ganzer Kurven geprüft werden muß, ob diese Voraussetzung erfüllt ist.

Bild 2a zeigt die Schwellungsgeschwindigkeiten, die auf diese Weise gewonnen wurden, in Abhängigkeit von der Salizylatkonzentration. Da die Versuche sich über einen weiten Bereich von Konzentrationen und Hämolysegeschwindigkeiten erstrecken, ist die Geschwindigkeit in drei verschiedenen Maßstäben eingezeichnet. Sie steigt mit zunehmender Konzentration wachsend steiler an. Übersichtlicher werden die Verhältnisse bei Anwendung logarithmischen Maßstabs sowohl für die Konzentration als auch für die Schwellungsgeschwindigkeit. Bild 2b zeigt diese Darstellung. Der Logarithmus der Geschwindigkeit steigt zunächst linear mit dem Logarithmus der Konzentration an. Nach vorübergehender Abflachung der Kurve in der Gegend der Konzentration 0,7 mol wird dann der Anstieg zunehmend steiler.

Eine Sättigung wird, wie es zunächst scheint, nicht erreicht. Nun ist aber zu berücksichtigen, daß die Schwellungsgeschwindigkeit auch bei konstanter Permeabilität von der Salzkonzentration abhängt, da die pro Zeiteinheit eindringende Salzmenge mit steigender Konzentration

zunehmen muß. Nimmt man Proportionalität zwischen Schwellungsgeschwindigkeit und Konzentration an (vgl. dazu Bühlmann, Liechti und Wilbrandt 1942 (2) sowie Wilbrandt 1942 (5), so wäre bei „Sättigung" der Membran an Salizylat und konstanter Permeabilität ein weiteres lineares Ansteigen der Kurve in einem Winkel von 45° zu erwarten, wie es in Bild 2b gestrichelt eingezeichnet ist. Offenbar bedeutet der Wendepunkt der Kurve eine Annäherung an diese Gerade. Daß

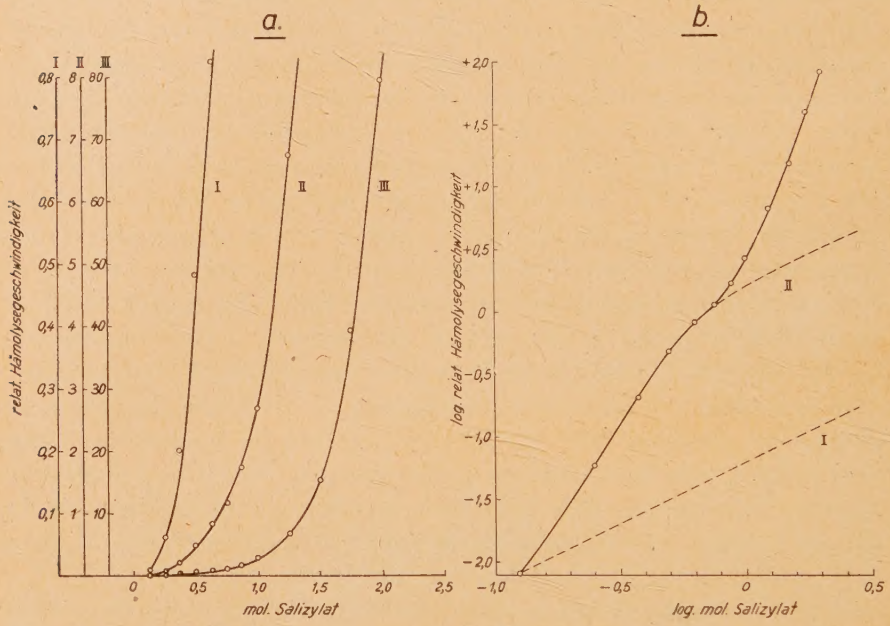

Bild 2. Abhängigkeit der Hämolysegeschwindigkeit von der Salizylatkonzentration.
a) in innerem Maßstab b) in logarithmischem Maßstab.
Ordinate: reziproke Hämolysezeit als Maß der Hämolysegeschwindigkeit.
Abszisse: Salizylatkonzentration.

sie sie nicht erreicht, sondern erneut steiler ansteigt, kann darauf beruhen, daß bei hohen Konzentrationen die Hämolysezeiten sehr kurz werden, so daß die Geschwindigkeit der Eiweißdenaturierung nicht mehr zu vernachlässigen ist gegenüber der Geschwindigkeit des Ioneneintritts. Die Denaturierungsgeschwindigkeit nimmt aber vermutlich auch oberha b der Sättigungskonzentration noch zu.

Der untere Teil der Kurve scheint zunächst auch nicht dem Verlauf einer Adsorptionsisotherme zu entsprechen, die ja von Anfang an mit kontinuierlich abnehmender Steilheit ansteigt, während die Kurven des Bild 2a mit zunehmender Steilheit steigen. In diesem Teil der Kurven

ist jedoch eine Übereinstimmung mit der Isotherme auch nicht zu erwarten. Die Konzentrationsabhängigkeit der Denaturierung von Hämoglobin durch Salizylat [Anson und Mirsky 1934 (7)] steigt bei niedrigen Salizylatkonzentrationen ebenfalls mit zunehmender Steilheit. Das steht mit der Annahme einer adsorptionsähnlichen Bindung dann nicht in Widerspruch, wenn zur Denaturierung die Zahl der gebundenen Anionen eine gewisse Schwelle überschreiten muß.

Die Theorie der Eiweißdenaturierung von Mirsky und Pauling (8) nimmt in der Tat eine solche Schwelle an. Die Bindung ist nach dieser Theorie eine Wasserstoffbindung, die die vorher bestehenden Wasserstoffbindungen zwischen verschiedenen Stellen der Eiweißmolekülkette ersetzt und so die Kette entfaltet. Aus der Aktivierungsenergie der Wärmedenaturierung berechnen die Autoren, daß pro Eiweißmolekül 30 Wasserstoffbindungen gesprengt werden müssen, von denen (nach der Reaktionswärme zu schließen) etwa 6 nach erfolgter Denaturierung gesprengt bleiben. Dieselbe Wirkung würde also die Bindung von 6 Salizylationen pro Eiweißmolekül haben können.

2. Der negative Temperaturkoeffizient der Salizylatbindung

Die Annahme einer Sättigungskonzentration der Salizylatbindung läßt sich auch mit Hilfe des Temperaturkoeffizienten der Salizylathämolyse prüfen. Wenn die oben gegebene Deutung des „negativen" Koeffizienten bei tiefen Temperaturen richtig ist, wäre zu erwarten, daß mit Annäherung an die Sättigungskonzentration der Temperaturkoeffizient weniger negativ wird. Denn wenn schon bei der höheren Temperatur die Membran fast gesättigt ist, kann Senkung der Temperatur die adsorbierte Menge nicht oder kaum mehr erhöhen.

Um dies zu prüfen, wurden osmotische Schwellungskurven in Kaliumsalizylatlösungen unter Variation sowohl der Salzkonzentration als auch der Temperatur aufgenommen und, wie oben beschrieben, aus ihnen die relativen Geschwindigkeiten bestimmt.

Als Maß für die „negative" Temperaturabhängigkeit eignet sich aus noch zu besprechenden Gründen am besten das Verhältnis der Schwellungsgeschwindigkeiten bei zwei sehr tiefen Temperaturen, z. B. 0° und 7°. Bild 3 zeigt diese Verhältniszahl in Abhängigkeit von der Salizylatkonzentration. Sie nimmt in der Tat, entsprechend der Erwartung aus der obigen Überlegung, mit steigender Salizylatkonzentration ab. Die Annahme der „adsorptiven" Bindung der Salizylationen gewinnt dadurch eine weitere Stütze.

Nun ist aber der Temperaturkoeffizient der Schwellungsgeschwindigkeit nicht im ganzen Temperaturbereich von 0—40° kleiner als eins,

sondern nur bei tiefen Temperaturen. Bei hoher Temperatur ist er größer als eins und die Schwellungsgeschwindigkeit hat daher bei mittleren Temperaturen in der Gegend von 20° C ein Minimum, wie schon aus den Versuchen früherer Mitteilungen [Liechti und Wilbrandt 1941 (3), Leu, Liechti und Wilbrandt 1942 (1)] hervorging. Die Bildung dieses Minimums war auf die Überlagerung von zwei gegenläufig temperaturabhängigen Faktoren zurückgeführt worden: der Ionenbindung und damit zusammenhängend der Permeabilitätsänderung mit negativem und der Diffusionsgeschwindigkeit durch die Membran mit (bei konstanter Permeabilität) positivem Koeffizienten.

Daß dabei ein Minimum der Schwellungsgeschwindigkeit bei einer mittleren Temperatur auftritt, zeigt, daß mindestens einer der beiden Koeffizienten im Temperaturbereich von 0—40° nicht konstant ist. Wären sie beide konstant, so würde man ihre Überlagerung gar nicht erkennen, es würde ein konstanter mittlerer Temperaturkoeffizient (das Produkt der beiden Koeffizienten) resultieren[1]. Das auftretende Minimum zeigt, daß entweder der Koeffizient der Ionenbindung mit steigender Temperatur weniger negativ oder derjenige der Membrandiffusion stärker positiv wird (oder beides). Es ergibt sich daraus, wie schon erwähnt, daß der Einfluß des Ionenbindungskoeffizienten zweckmäßig bei tiefer, derjenige des Membrandiffusionskoeffizienten zweckmäßig bei hoher Temperatur zu studieren ist.

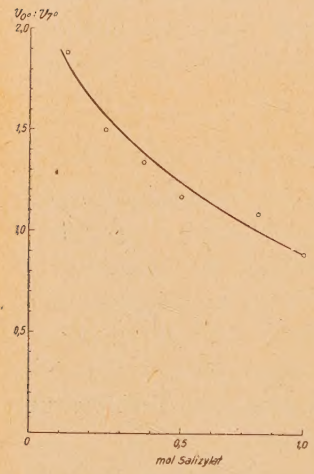

Bild 3
Verhältnis der Schwellungsgeschwindigkeit bei 0° und 7° C in Kaliumsalizylatlösung von verschiedener Konzentration.

Wenn nun bei Variation der Salizylatkonzentration der Temperaturkoeffizient der Ionenbindung, wie oben gezeigt, weniger negativ wird, so ist zu erwarten, daß das Minimum der Schwellungsgeschwindigkeit sich nach tieferen Temperaturen verschiebt, um bei erreichter Sättigung, wenn nur noch der positive Temperaturkoeffizient der Membrandiffusion wirksam ist, ganz zu verschwinden. Diese Erwartung ließ sich beim Vergleich der niedrigsten und der

[1] Es sei darauf hingewiesen, daß der gebräuchlich gewordene Ausdruck „negativer Temperaturkoeffizient" (der Abnahme einer Größe mit steigender Temperatur bedeutet), genau genommen, nicht in Verbindung mit dem Van't Hoffschen Koeffizienten Q_{10} gebraucht werden darf. Dieser, der das Verhältnis der Werte einer Größe bei zwei verschiedenen Temperaturen bedeutet, wird nie negativ, sondern kann nur größer oder kleiner als eins sein.

höchsten verwendeten Salizylatkonzentration (0,125 mol und 1,0 mol) bestätigen, wie Bild 4 zeigt. Die relativen Schwellungsgeschwindigkeiten sind für die beiden Konzentrationen in verschiedenem Maßstab gezeichnet, um einen Vergleich der Kurvenform zu ermöglichen.

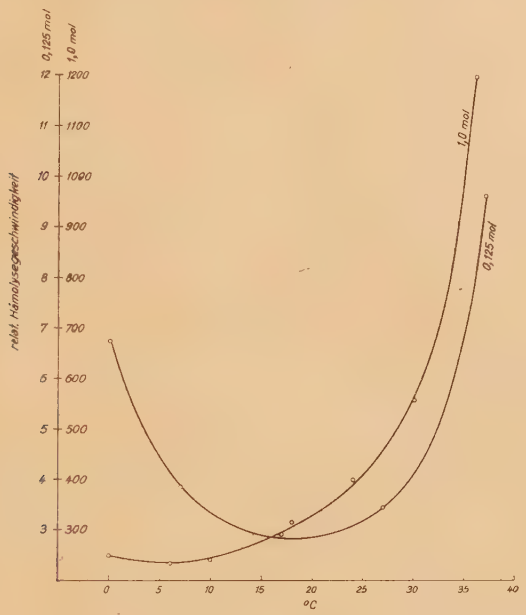

Bild 4. Temperaturabhängigkeit der Hämolysegeschwindigkeit in 2 Konzentrationen von Kaliumsalizylat.

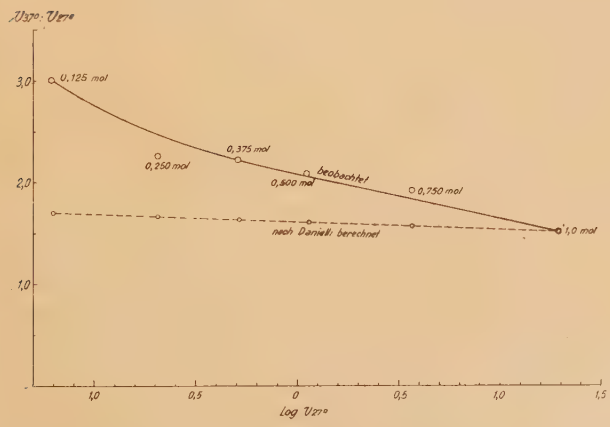

Bild 5

Abhängigkeit des Geschwindigkeitsverhältnisses der Hämolyse bei 37° und 27° C von der Hämolysegeschwindigkeit bei 27° C für verschieden konzentrierte Kaliumsalizylatlösungen.

Für 0,125 mol Salizylat liegt das Minimum etwa bei 20°, für 1,0 mol etwa bei 5°.

Beim Vergleich einer größeren Reihe von Zwischenkonzentrationen ließ sich allerdings keine kontinuierliche Verschiebung des Minimums nachweisen, und zwar offenbar deshalb, weil nicht nur die Temperaturabhängigkeit der Ionenbindung, sondern auch diejenige der Membrandiffusion von der Salizylatkonzentration beeinflußt wird. Wählt man als Maß der letzteren das Verhältnis der Schwellungsgeschwindigkeiten bei 37° und bei 27° (s. oben), so ergibt sich, wie Bild 5 zeigt, eine deutliche Abnahme dieser Verhältniszahl mit steigender Salizylatkonzentration. Der positive Temperaturkoeffizient der Membrandiffusion nimmt also offenbar mit fallender Salzkonzentration, d. h. mit abnehmender Kationenpermeabilität ebenfalls zu. Bezüglich der Verschiebung des Minimums wirken die Konzentrationsabhängigkeiten der beiden Temperaturkoeffizienten einander entgegen.

Die Zunahme des Temperaturkoeffizienten der Membrandiffusion mit fallender Permeabilität ist von Interesse im Hinblick auf die Theorie dieses Koeffizienten. Daß die Diffusion durch die Zellmembran einen positiven Temperaturkoeffizienten von unter Umständen beträchtlicher Höhe besitzt, ist aus zahlreichen Untersuchungen bekannt. Schon im Jahre 1928 fand Ege einen Temperaturkoeffizienten von 2 bis 3 für das Eindringen von Glukose in Erythrozyten, was er als einen Hinweis dafür betrachtete, daß chemische Vorgänge dabei eine Rolle spielen. In neuerer Zeit sind sowohl an roten Blutkörperchen [Jacobs, Glaßmann und Parpart 1935 (9)] als auch vor allem an Pflanzenzellen [Wartiovaara 1941 (10)] noch höhere Koeffizienten in zahlreichen Fällen gefunden worden. Davson und Danielli (1935) (11) haben gezeigt, daß die Beteiligung chemischer Vorgänge aus dem Auftreten hoher Temperaturkoeffizienten nicht notwendigerweise zu schließen ist. Hohe Koeffizienten sind nach diesen Autoren dann zu erwarten, wenn der Diffusion durch die Zellmembran eine Potentialschranke entgegensteht, so daß die Moleküle zum Passieren der Membran eine bestimmte Minimalenergie benötigen, die man in Analogie zur Aktivierungsenergie chemischer Reaktionen als Aktivierungsenergie der Diffusion bezeichnen kann.

Die Anschauungen von Davson und Danielli fanden eine Bestätigung in dem Befund von Jacobs c. s., daß im allgemeinen bei roten Blutkörperchen hoher Temperaturkoeffizient und geringe Permeabilität gemeinsam auftreten und umgekehrt. Das ist dann zu erwarten, wenn der Unterschied in der Permeabilität auf verschiedener Höhe der Potentialschranke beruht.

Es ist nun allerdings auch denkbar, daß verschiedene Permeabilität auch bei gleicher Potentialschranke auftreten kann, nämlich dann, wenn den Molekülen an der Membran zweier Zellarten ungleich große Flächen zur Diffusion zur Verfügung stehen; das heißt in der Sprache der Porentheorie: wenn nicht das elektrische Feld in der einzelnen Pore, sondern die Zahl der Poren pro Flächeneinheit die beiden Zellen unterscheidet.

Permeabilitätsänderungen können danach auf zwei grundsätzlich verschiedenen Wegen zustande kommen. Bei einer Erhöhung der Permeabilität kann einerseits die Potentialschranke erniedrigt werden, so daß eine größere Zahl von Molekülen die erforderliche Aktivierungsenergie besitzt und die Diffusionsgeschwindigkeit aus diesem Grunde ansteigt. Andererseits kann die gesamte für die Diffusion zugängliche Fläche vergrößert werden, ohne daß die Potentialschranken dabei ihre Höhe ändern. Man könnte diese beiden Mechanismen der Permeabilitätszunahme einander als energetische oder intensive und als räumliche oder extensive Permeabilitätssteigerung gegenüberstellen. Als Kriterium für ihre Unterscheidung wäre dann das Verhalten des Temperaturkoeffizienten zu betrachten, der bei der intensiven Permeabilitätsänderung abnehmen, bei der extensiven unverändert bleiben müßte.

In diesem Sinne wäre die Permeabilitätssteigerung durch Salizylat zunächst als intensive Permeabilitätsänderung aufzufassen, da mit steigender Permeabilität (zunehmender Salizylatkonzentration) der Temperaturkoeffizient abnimmt. Der quantitative Vergleich mit der Danielli'schen Theorie zeigt jedoch, daß noch weitere Faktoren im Spiel sein müssen.

Danielli (12) gibt für die Geschwindigkeit der Diffusion folgende Gleichung:

$$R = \frac{N_0}{2V}\sqrt{\frac{2kT}{\pi m}}\, e^{-\frac{mv^2}{2kT}} \cdot \text{const.} \qquad (1)$$

wo R die Zahl der Moleküle (Gesamtzahl N_0) im Volumen V bedeutet, die die erforderliche Energie $\frac{mv^2}{2}$ besitzen. k ist die Boltzmannkonstante, T die absolute Temperatur, m das Molekulargewicht. Aus dieser Gleichung kann man den Temperaturkoeffizienten zwischen den in unseren Versuchen verwendeten Temperaturen 27° und 37° ($Q_{10} = P_{37} : P_{27}$) als Funktion von P_{27}, der Permeabilität bei 27°, berechnen. Es ergibt sich

$$Q_{10} = K\sqrt[31]{\frac{c}{P_{27}}} \qquad (2)$$

wo K eine Konstante, c die Konzentration bedeutet. Diese Gleichung ist der quantitative Ausdruck der erwähnten Beziehung, nach der der Temperaturkoeffizient mit abnehmender Permeabilität steigt.

Bild 5 zeigt nun die mit verschiedenen Salizylatkonzentrationen gefundenen Temperaturkoeffizienten in Abhängigkeit von der Schwellungsgeschwindigkeit bei 27°. Der Temperaturkoeffizient steigt tatsächlich mit abnehmender Permeabilität an, aber der Anstieg ist beträchtlich steiler, als der Gleichung (2) entspricht. Eine nach der Gleichung berechnete Kurve ist zum Vergleich mit eingezeichnet.

Der komplizierende Faktor ist vermutlich die Temperaturabhängigkeit der Eiweißdenaturierung. Die Spontandenaturierung von Eiweiß (bei Abwesenheit stark denaturierender Salze) hat zwar einen so hohen Temperaturkoeffizienten, daß sie zwischen 30° und 40° überhaupt noch nicht mit meßbarer Geschwindigkeit abläuft. Es ist aber bekannt, daß bei Verschiebung des pH nach der sauren oder alkalischen Seite der Temperaturkoeffizient schon abnimmt, bevor das stark saure bzw. alkalische Gebiet erreicht wird, in dem die Denaturierung so schnell abläuft, daß sie als Säure- oder Alkalidenaturierung bezeichnet wird. Es ist nicht unwahrscheinlich, daß ansteigende Salizylatkonzentration den Temperaturkoeffizienten ähnlich beeinflußt wie pH-Verschiebung, und daß die Temperaturabhängigkeit der Schwellungsgeschwindigkeit dadurch mit beeinflußt wird. Untersuchungen darüber sind in Angriff genommen.

Zusammenfassend ergibt sich aus den Versuchen mit verschiedenen Salizylatkonzentrationen, daß die Temperaturabhängigkeit der Schwellungsgeschwindigkeit vermutlich durch mindestens drei Faktoren beeinflußt wird: bei hohen Temperaturen durch die Aktivierungsenergien der Eiweißdenaturierung und der Membrandiffusion, bei tiefen außerdem noch durch den negativen Temperaturkoeffizienten der Ionenadsorption.

3. Die Temperaturabhängigkeit der Schwellung in verschiedenen Salzlösungen

Die Versuche mit verschiedenen Salzen wurden, um wenigstens bei den stärker wirksamen Salzen in der Nähe der Sättigungskonzentration zu arbeiten, mit molaren Lösungen, also sehr hohen Konzentrationen, ausgeführt. Die Ergebnisse dieser Versuche zeigten stärkere Schwankungen als in den Versuchsreihen des vorhergehenden Abschnittes und es mußte daher eine größere Anzahl Versuchsserien angestellt werden. Die im folgenden wiedergegebenen Resultate wurden in insgesamt 6 Versuchsreihen gewonnen, bei denen jeweils die ganzen Schwellungskurven aufgenommen wurden.

Der Grund für die stärkeren Schwankungen liegt wahrscheinlich in erster Linie darin, daß die oben erwähnte Voraussetzung vergleichbarer Kurvenformen schlecht erfüllt ist. Bild 6 zeigt die Schwellungskurven

bei verschiedenen Temperaturen für Kaliumchlorid. Während die Kurven bei höheren Temperaturen einigermaßen gleichen Verlauf zeigen, ist der Schwellungsverlauf bei tiefen Temperaturen grundsätzlich verschieden. Die Kurven steigen zunächst steiler an, flachen sich dann jedoch wieder ab, so daß es zu einem Schnitt mit den Kurven bei höherer Temperatur kommt. Dieses Verhalten ist nicht ein Einzelfall, sondern fand sich in

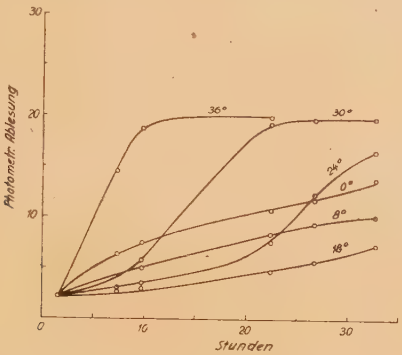

Bild 6. Hämolysekurven in 1,0 molarer Kaliumchloridlösung bei verschiedenen Temperaturen.

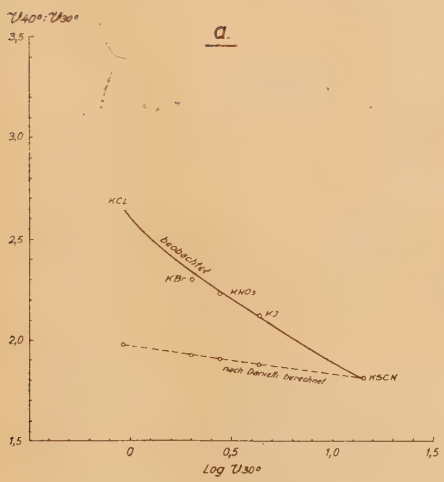

Bild 7a

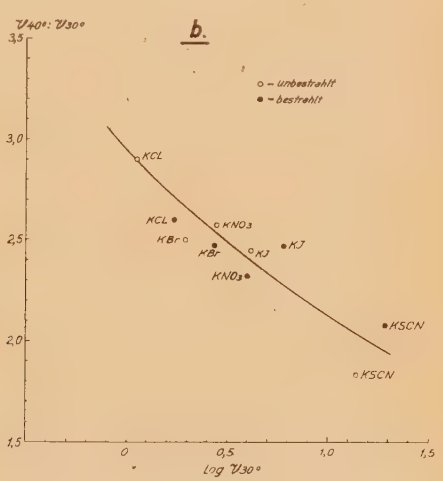

Bild 7b

Bild 7a. Verhältnis der Hämolysegeschwindigkeit bei 40° und 30° C in verschiedenen 1,0 molaren Kaliumsalzlösungen in Abhängigkeit von der Schwellungsgeschwindigkeit bei 30° C. Mittelwerte aus 4 Versuchsserien mit unbestrahltem Blut.

Bild 7b. Verhältnis der Hämolysegeschwindigkeit bei 40° und 30° C in verschiedenen 1,0 molaren Kaliumsalzlösungen in Abhängigkeit von der Schwellungsgeschwindigkeit bei 30° C. 2 parallele Versuchsserien mit unbestrahltem und röntgenbestrahltem Blut (120000 r).

prinzipiell gleicher Weise bei mehr oder weniger allen verwendeten Salzen. Worauf es beruht, muß zunächst offen bleiben. Die Kurvenform bei tiefen Temperaturen ähnelt derjenigen von nichtosmotischen Hämolysen; ob hier ein anderer Hämolysetyp vorliegt, ist aber noch nicht untersucht.

Für die vorliegende Fragestellung hat diese unerwartete Beobachtung die Folge, daß die Geschwindigkeiten bei tiefen Temperaturen aus den Kurven nicht in gleich befriedigender Weise ausgewertet werden können wie bei den Versuchen mit verschiedenen Salizylatkonzentrationen, so daß die Resultate bei tiefen Temperaturen nicht verwertbar werden.

Bezüglich des Geschwindigkeitsverhältnisses 40°:30° (Q_{10}) zeigt sich auch hier, wenn die verschiedenen Salze miteinander verglichen werden, eine Beziehung zur Permeabilität im gleichen Sinne wie im vorhergehenden Abschnitt. Bild 7a zeigt Q_{10} in Abhängigkeit von der Schwellungsgeschwindigkeit bei 30° (logarithmisch). Bild 7a gibt die Mittelwerte aus vier Versuchsserien mit unbestrahltem Blut. Es ergibt sich eine deutliche Korrelation im Sinne eines ansteigenden Temperaturkoeffizienten bei abnehmender Schwellungsgeschwindigkeit.

Auch hier bestehen aber die gleichen Bedenken, die Beobachtung ausschließlich auf die Daniellische Gesetzmäßigkeit zu beziehen, wie bei den Salizylatversuchen. In Bild 7a ist wieder eine nach Gleichung (2) berechnete Kurve mit eingezeichnet, die wiederum viel flacher verläuft als die Kurve der beobachteten Werte. Das legt die Vermutung nahe, daß auch hier der Temperaturkoeffizient der Denaturierung mit eine Rolle spielt, d. h. daß er sich auch bei verschiedenen Salzen in prinzipiell gleicher Weise abstuft wie bei Variation des pH.

Bestrahltes und unbestrahltes Blut kann nur innerhalb einer und derselben Versuchsreihe verglichen werden. Wir verfügen nur über ein vergleichbares Versuchspaar, dessen Ergebnisse in Bild 7b wiedergegeben sind. Die Streuung ist hier stärker als in der gemittelten Kurve von Bild 7a. Immerhin ergibt sich, daß die mit bestrahltem und mit unbestrahltem Blut erhaltenen Punkte sich um die gleiche Kurve gruppieren. Es ist daher wahrscheinlich, daß die Bestrahlung Permeabilität und Temperaturkoeffizient ebenfalls gleichzeitig und in prinzipiell gleicher Weise beeinflußt wie Ionenart, Salizylatkonzentration oder pH, so daß hier vielleicht eine allgemeine Gesetzmäßigkeit vorliegt.

Die Versuche bei tiefen Temperaturen mit verschiedenen Kaliumsalzen streuten stark und ergaben bezüglich einer Beziehung zwischen dem Geschwindigkeitsverhältnis 0° zu 10° und der absoluten Schwellungsgeschwindigkeit kein klares Resultat, was mit dem abnormen Verlauf der Schwellungskurven bei tiefen Temperaturen (s. oben) zusammenhängen dürfte.

Dagegen ist interessant, daß Röntgenbestrahlung den Wert des Geschwindigkeitsverhältnisses q deutlich und regelmäßig herabsetzt, wie die folgende Tabelle zeigt.

Geschwindigkeitsverhältnis der Schwellung 0° zu 10° in verschiedenen Salzlösungen (Mittelwerte)

	Unbestrahlt	Bestrahlt
KCl	1,86	1,20
KBr	1,62	1,39
KNO_3	1,69	1,26
KI	1,91	1,64
KSCN	1,65	1,51

Bei allen Salzen ist q nach der Bestrahlung kleiner. Es zeigt sich also hier wieder die gleiche Gesetzmäßigkeit wie bei Variation der Salizylatkonzentration: wenn die Schwellung rasch abläuft, wird q kleiner und umgekehrt. Nach unserer Deutung wäre daraus zu schließen, daß auch die Bestrahlung die Ionenpermeabilität auf dem Weg über das Adsorptionsvermögen für Anionen beeinflußt, ein Schluß, der sich in den vorangegangenen Mitteilungen auch aus anderen Beobachtungen ergab.

B. Die Temperatur während der Bestrahlung

Während die bisherigen Versuche sich auf die Temperatur während der Schwellungsphase bezogen, ebenso wie alle in den vorhergehenden Mitteilungen erwähnten Versuche, soll nun eine Reihe von Versuchen wiedergegeben werden, die den Einfluß der Temperatur während der Bestrahlung zum Gegenstand hatten. In diesen Versuchen wurde das Blut nur während der Bestrahlung verschiedenen Temperaturen ausgesetzt, während die ganze Nachperiode, in der die Schwellungsgeschwindigkeit beobachtet wurde, sich bei 6° C abspielte. Zur Kontrolle wurden unbestrahlte Blutsuspensionen benützt, die eine gleiche Zeit ohne Bestrahlung auf hoher Temperatur gehalten, dann aber ebenfalls während der Schwellungszeit bei 6° C aufbewahrt wurden.

Bild 8 zeigt die Ergebnisse dieser Versuche. Das Verhalten der mit Ultraviolett bestrahlten und der röntgenbestrahlten Suspensionen ist grundsätzlich gleich. In beiden Fällen steigt die Schwellungsgeschwindigkeit bei Temperaturen unterhalb des Koagulationsgebietes relativ flach, in der Nähe von 56° dann aber ziemlich steil an. Ein Unterschied im Sinne der Beobachtungen von Dessauer und Rajewsky (6) fand sich nicht.

Vergleicht man nun aber mit dem Verhalten der bestrahlten Suspension dasjenige der unbestrahlten Kontrollsuspensionen, so ist bei

letzteren der Anstieg der Schwellungsgeschwindigkeit bei hoher Temperatur noch steiler. Bildet man nun das Verhältnis der Schwellungsgeschwindigkeiten des bestrahlten und des unbestrahlten Blutes bei den verschiedenen Temperaturen, sozusagen den Beschleunigungsfaktor, der durch die Bestrahlung eingeführt wird, so zeigt dieser Faktor eine deutliche Abnahme mit Ansteigen der Temperatur. Die relative Wirkung der Bestrahlung, bezogen auf das Verhalten der Kontrollsuspensionen, hat also einen negativen Temperaturkoeffizienten.

Dieses Verhalten scheint uns mit der Annahme einer Eiweißdenaturierung durchaus im Einklang zu sein. Es sei zunächst auf den Unter-

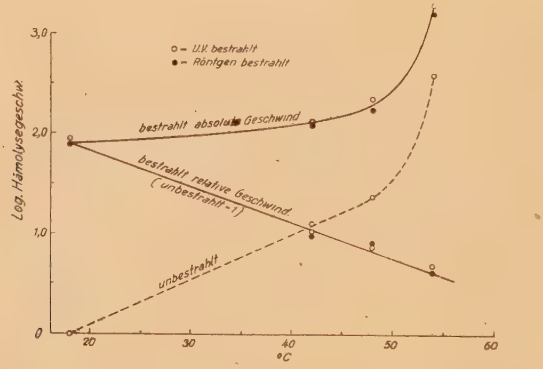

Bild 8

Hämolysegeschwindigkeit unbestrahlten, mit Ultraviolett bestrahlten und mit Röntgen bestrahlten Blutes in Abhängigkeit von der Temperatur während der Bestrahlungszeit. Schwellungsphase in allen Versuchen bei 6° C.
Dosis: Röntgen: 120000 r.
Ultraviolett: Hanaulampe SR 300 im Abstand von 20 cm.
Bestrahlungsdauer 2 Stunden.

schied zwischen Röntgen- und Ultraviolettbestrahlung eingegangen. Dessauer und Rajewsky begründen die von ihnen geforderte Sonderstellung der Ultraviolettwirkung bezüglich der Temperaturabhängigkeit damit, daß hier der Primärvorgang ein photochemischer Prozeß und daher die aufgenommene Energie von der Temperatur unabhängig sei. Bei der Röntgenbestrahlung addiere sich die aufgenommene Energie zu der schon vorhandenen kinetischen Energie der Moleküle, und die Schwellenenergie für die Denaturierung werde daher bei steigender Temperatur schon durch kleinere Bestrahlungsdosen erreicht.

Unsere Resultate stehen in bezug auf den Temperaturkoeffizienten der Röntgenstrahlenwirkung mit diesen Überlegungen im Einklang, deuten

aber darauf hin, daß in unserem Falle ein prinzipieller Unterschied zwischen UV- und Röntgenstrahlung nicht besteht.

Daß die Beschleunigung der Schwellung mit zunehmender Temperatur geringer wird, scheint plausibel. In einem Temperaturgebiet, in dem praktisch keine Moleküle die Aktivierungsenergie zur Denaturierung besitzen, wird die durch Bestrahlung auslösbare relative Wirkung größer sein müssen als bei Temperaturen, bei denen schon ohne Bestrahlung ein gewisser Bruchteil der Moleküle die Aktivierungsenergie der Denaturierung besitzt.

Zusammenfassung

Die Wirkung der Temperatur auf die Salizylat- und die Strahlenhämolyse wurde weiter untersucht, und zwar gesondert bezüglich der Schwellungsphase (Nachperiode der Bestrahlung) und der Bestrahlungszeit selbst.

1. Die in früheren Arbeiten beschriebene Beschleunigung der osmotischen Schwellung in Salizylatlösungen bei tiefen Temperaturen ist am stärksten bei niedrigen Salizylatkonzentrationen und nimmt mit steigender Konzentration ab. Dies steht in Übereinstimmung mit der Annahme einer Ionenadsorption.

2. Der Temperaturkoeffizient der Schwellungsgeschwindigkeit ist bei hohen Temperaturen ebenfalls in niedrigen Salizylatkonzentrationen, d. h. bei langsamer Ionendiffusion, größer als in hohen bei schneller Diffusion. Dies steht in qualitativer Übereinstimmung mit dem Daniellischen Prinzip. Quantitativ ist die Änderung des Temperaturkoeffizienten jedoch steiler, als nach Danielli zu erwarten ist, vermutlich weil auch der Temperaturkoeffizient der Eiweißdenaturierung sich mit der Salizylatkonzentration ändert und die Temperaturabhängigkeit der Schwellung mit beeinflußt.

3. Auch bei Versuchen mit verschiedenen Kaliumsalzlösungen in gleicher Konzentration steigt der Temperaturkoeffizient mit abnehmender Schwellungsgeschwindigkeit, und zwar ebenfalls steiler, als nach Danielli zu erwarten ist. Auch hier ist wahrscheinlich der Temperaturkoeffizient der Eiweißdenaturierung beteiligt.

4. Die Beschleunigung der Schwellung durch tiefe Temperaturen wird durch Röntgenbestrahlung vermindert. Dies steht in Übereinstimmung mit der Annahme, daß die Wirkung der Salze eine Ionenadsorption zur Voraussetzung hat und daß die Bestrahlung diese Adsorption begünstigt.

5. Die Temperatur während der Bestrahlung beeinflußt die Geschwindigkeit der Röntgen- und der Ultravioletthämolyse in gleicher Weise.

Die absolute Schwellungsgeschwindigkeit nimmt mit der Temperatur zu, besonders steil in der Nähe von 50°. Die Beschleunigung der osmotischen Schwellung durch die Bestrahlung (Vergleich mit unbestrahltem Kontrollblut) hat einen negativen Temperaturkoeffizienten. Die Beziehungen zu den Anschauungen Dessauers und Rajewskys werden diskutiert.

*

Wir danken auch an dieser Stelle für die Unterstützung der Schweiz. Liga für Krebsbekämpfung bestens.

Schrifttum

1. J. Leu, A. Liechti, W. Wilbrandt, Strahlenther. 71 (1942): 487. — 2. A. Bühlmann, A. Liechti, W. Wilbrandt, Strahlenther. 71 (1942): 285. — 3. A. Liechti, W. Wilbrandt, Strahlenther. 70 (1941): 541. — 4. K. Burgener, Diss. Bern 1942. — 5. W. Wilbrandt, Pflüg. Arch. 245 (1941): 22. — 6. G. Rajewsky, Strahlenther. 33 (1929): 362, zit. in „Zehn Jahre Forschung auf dem physikalisch-medizinischen Grenzgebiet" von F. Dessauer. Leipzig 1931. — 7. M. L. Anson, A. E. Mirsky, J. Gen. Physiol. 17 (1934): 399. — 8. A. E. Mirsky, L. Pauling, Proc. Nat. Acad. Sci. 22 (1936): 439. — 9. M. H. Jacobs, H. N. Glaßmann, A. K. Parpart, J. Cell. Comp. Physiol. 7 (1935): 495. — 10. V. Wartiovaara, Ann. Bot. Zool.-Bot. Fenn. Vanamo 16 (1941), 1. / Biochem. Z. 302 (1939): 277. — 11. J. F. Danielli, H. Davson, J. Cell. Comp. 5 (1935): 495. — 12. J. F. Danielli, Trans. Far. Soc. 33 (1937): 1139.